

Targeted treatment of cancer using the angiogenesis inhibitor anginex

Citation for published version (APA):

Brandwijk, R. J. M. G. E. (2007). *Targeted treatment of cancer using the angiogenesis inhibitor anginex*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070920rb>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070920rb](https://doi.org/10.26481/dis.20070920rb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

This thesis describes the development of the recombinant equivalent of the synthetic angiogenesis inhibitor anginex and the use of the anginex gene and recombinant protein in order to develop new angiostatic strategies for anticancer treatment. Angiogenesis, i.e. the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is essential for tumor growth and the formation of metastasis. It is mainly initiated by a deficiency in oxygen and nutrients in the growing tumor, after which a cascade of events occur. Because of its key role in tumor progression, the abrogation of angiogenesis has been suggested as an anticancer therapy. Perhaps never before has any anticancer therapy generated such interest, skepticism and expectations as antiangiogenic therapy.

The concept of antiangiogenic therapy is simple and elegant: inhibit the growth of activated EC to starve the tumor to death with little acquired resistance and side-effects. This inspired researchers to search for molecules capable of inhibiting tumor angiogenesis. Many angiogenesis inhibitors are derived from endogenous molecules, like e.g. endostatin from collagen XVIII. In our laboratory, anginex was developed as a synthetic angiostatic peptide. The sequence of the peptide was based on the structure of known endogenous inhibitors and basic folding principles in order to form a water soluble β -sheet forming peptide. Anginex is a potent angiogenesis inhibitor capable of inhibiting *in vitro* adhesion, migration and proliferation of activated EC and subsequent induction of apoptosis in these cells. *In vivo*, anginex is an effective anti-tumor agent.

We hypothesized that an artificial anginex gene encoding recombinant protein could be used as a molecular tool for receptor identification, angiostatic gene therapy and targeting. To be able to use anginex in such strategies, the anginex gene encoding for a functional recombinant protein with comparable characteristics had to be developed. In addition to traditional techniques to screen for angiostatic and biochemical properties, we first developed a new approach to simultaneously study the effects of an angiogenesis inhibitor on the *in vivo* angiogenic expression profile of several important angiogenic factors in tumor cells and vascular cells within a single tumor in a xenograft tumor model (Chapter 2). Therefore, human- and mouse-specific primers were designed for these factors and used in quantitative real-time RT-PCR to determine their expression levels. We observed that in response to angiostatic treatment, tumor cells significantly upregulate bFGF expression and downregulate VEGF receptor expression. This was accompanied by downregulation of VEGF-B and -D, and upregulation of angiopoietin-3 as well as angiopoietin receptors in non-tumor cells. Subsequently, we constructed the artificial gene encoding the biologically peptide and produced the recombinant protein in *Pichia Pastoris* (Chapter 3). Analysis on the structural level revealed that recombinant anginex, like the synthetic peptide, has a β -sheet structure and the preference for forming a dimer. Analysis on the functional level *in vitro* showed that the recombinant protein is active at inhibiting EC growth and migration. The *in vivo*

angiostatic capacity of the recombinant protein was determined in a model of developmental angiogenesis (chicken chorioallantoic membrane assay) and in a xenograft mouse tumor model (human MA148 ovarian carcinoma in athymic mice) (Chapter 3 and 4). In both models, recombinant anginex showed comparable angiogenesis inhibiting properties as its synthetic equivalent. These studies demonstrated that it is possible to produce a functionally active protein version of a rationally designed peptide, using an artificial gene and the recombinant protein approach.

To explore the therapeutic applicability of the anginex gene, stable transfectants of murine B16F10 melanoma cells expressing recombinant anginex were made (Chapter 4). Culture supernatants of these cells inhibited endothelial cell proliferation, in contradiction to supernatants of the wild type cell line. In addition, subcutaneous injection of these stable transfected cells in C57BL/6 mice revealed an extensive additional delay in tumor growth in comparison to systemic treatment with synthetic anginex. These data suggest that the anginex gene can be applied in gene therapy approaches and that angiostatic therapy is most effective when applied at the start of the angiogenic process.

Gene therapy has been a promise for cancer treatment for years. To fulfil its expectations, the delivery systems have to be optimized and specific targets must be identified to allow specific cancer treatment. Targeting tumor vessels is especially interesting since the vasculature is easily accessible, less prone to mutations and treating the vasculature gives probably rise to fewer side effects. In Chapter 5, we review the use of targeted gene delivery for angiostatic cancer treatment, with a focus on the most commonly and frequently used gene transfer vehicles and targeting strategies for viral as well non-viral delivery systems.

From previous studies it was known that anginex homes to the angiogenic vasculature inside tumors. Therefore, we hypothesized that anginex could be used as targeting ligand. To investigate this application, we conjugated anginex to fluorescently labeled paramagnetic liposomes (Chapter 6). Using phase contrast and fluorescence microscopy, we demonstrated that conjugated liposomes bind to endothelial cells. By performing competition experiments with unconjugated synthetic anginex, we demonstrated that this binding was anginex dependent. Using magnetic resonance imaging (MRI), we showed that anginex is at least as suitable for targeting MRI contrast agents as the well known cyclic RGD-peptide. This study suggests the applicability of anginex as an angiogenesis targeting ligand.

To get more insight in the mechanism of the angiostatic capacity of anginex and to be able to improve the interaction with its receptor, a receptor-finding study using yeast two-hybrid screening was applied, thereby identifying galectin-1 (gal-1) as its main target protein (Chapter 7). Galectin-1 was found to be overexpressed in endothelial cells of human tumors. Expression knockdown *in vitro* and *in vivo* lead to respectively inhibition of EC proliferation and migration, and disturbed and

defective vessel formation. The role of gal-1 in tumor angiogenesis was demonstrated in gal-1-null mice. In these mice, tumor growth was hampered and they did not respond to additional anginex treatment. The data imply that gal-1 is an important regulator of tumor angiogenesis and could be a potential target/marker for angiostatic cancer therapy.

From this thesis can be concluded that synthetic anginex as well as its recombinant equivalent are potent angiostatic proteins and that their use is not limited to the applicability as systemic inhibitors of angiogenesis. The encoding gene and protein have the potential to be a valuable tool in gene therapy and anti-cancer targeting strategies. The identification of the anginex receptor will possibly lead to the development of new inhibitors or to new intervention possibilities for tumor angiogenesis.

Summary

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en het gebruik van de recombinante equivalent van de synthetische angiogenese remmer anginex met als doelstelling het ontwikkelen van nieuwe anti-angiogenese strategieën als behandeling gericht tegen kanker. Angiogenese is gedefiniëerd als de vorming van nieuwe bloedvaten vanuit bestaande vaten. Angiogenese is noodzakelijk voor tumorgroei en de vorming van metastasen en het wordt voornamelijk geïnitieerd door een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen in de groeiende tumor. Hierdoor wordt een verscheidenheid aan elkaar gerelateerde processen in gang gezet. Gezien de sleutelrol tijdens de tumorontwikkeling is het stopzetten van het angiogene proces gesuggereerd als potentiële anti-kanker therapie. Dit heeft geleid tot een enorme interesse, verwachtingen en scepticisme ten opzichte van anti-angiogene therapie.

Het principe van anti-angiogenese therapie is elegant en eenvoudig: door de groei van geactiveerde endotheel cellen te voorkomen zal een tumor een hongerdood sterven zonder ernstige bijwerkingen en het ontwikkelen van resistentie gericht tegen de therapie. Dit concept heeft vele onderzoekers geïnspireerd te zoeken naar middelen die tumor angiogenese kunnen remmen. Veel angiogenese remmers zijn afgeleid van endogene moleculen, zoals bijvoorbeeld endostatine van collageen XVIII. In ons laboratorium hebben we de synthetische angiogenese remmer anginex ontwikkelt. De samenstelling van dit peptide is gebaseerd op de structuur van bekende angiogenese remmers en eiwitvouwing principes, zodat een wateroplosbaar β -sheet vormend peptide ontstaat. Het is gebleken dat anginex een krachtige angiogenese remmer is. Het is in staat om *in vitro* de adhesie, migratie en proliferatie van geactiveerde endotheel cellen te remmen en vervolgens in deze cellen apoptose te induceren. *In vivo* is anginex een effectief anti-tumor middel.

Wij stelden de hypothese dat een kunstmatig anginex gen coderend voor anginex gebruikt zou kunnen worden als moleculair hulpmiddel voor receptor identificatie, anti-angiogene gen therapie en targeting doeleinden. Om anginex voor deze strategieën te kunnen gebruiken diende eerst het anginex gen ontwikkeld te worden dat codeerd voor een recombinant eiwit met vergelijkbare eigenschappen. Als aanvulling op bestaande technieken om angiogenese remming en biochemische eigenschappen te bepalen, hebben wij eerst een methode ontwikkelt die op hetzelfde moment de invloed van een angiogenese remmer bepaalt op het expressie niveau van verschillende belangrijke angiogene factoren in de tumor- en vasculaire cellen binnen dezelfde tumor (Hoofdstuk 2). Daartoe zijn primers ontwikkelt die specifiek zijn voor de humane of muis angiogene factoren en gebruikt kunnen worden om het expressieniveau te bepalen met behulp van een kwantitatieve "real-time"-PCR. Het is gebleken dat tumoren als reactie op angiogenese remming, de expressie van bFGF verhogen en de expressie van VEGF-receptoren verlagen. Op hetzelfde moment was in de niet tumorcellen de expressie van VEGF-B en D verminderd en zowel de expressie van angiopoietine-3 en de

angiopoietine receptoren verhoogd. Vervolgens hebben wij het kunstmatige anginex gen gevormd dat codeerd voor de biologisch variant van de peptide en deze geproduceerd in de gist *Pichia Pastoris* (Hoofdstuk 3). Wij hebben aangetoond dat recombinant anginex op structureel niveau, net zoals het synthetisch peptide, een β -sheet structuur heeft en bij voorkeur een dimeer vormt. Analyse op functioneel niveau *in vitro* liet zien dat het recombinante eiwit in staat is om EC proliferatie en migratie te remmen. De *in vivo* angiostatische activiteit van het recombinante eiwit werd bepaald in een model van ontwikkelings angiogenese (chorionmembraan van het kippenei) en in een tumor model (humane MA148 ovarium carcinoma in naakte muizen) (Hoofdstuk 3 en 4). In beide modellen is aangetoond dat recombinant anginex een vergelijkbare werking heeft als zijn synthetische equivalent. Deze studies hebben aangetoond dat het mogelijk is om van een rationeel ontworpen peptide een functioneel biologische variant te maken door middel van de ontwikkeling van een kunstmatig gen en recombinante productie.

Om de mogelijk therapeutische toepasbaarheid van het anginex gen te onderzoeken is een stabiele transfectant van de muizen B16F10 melanoma cellijn gemaakt die in staat is om anginex tot expressie te brengen. (Hoofdstuk 4). In tegenstelling tot kweek supernatanten van de wild-type cellen, zijn de supernatanten van de getransfecteerde cellen al in staat om proliferatie van endotheel cellen te remmen. Het injecteren van de getransfecteerde cellen in C57/BL6 muizen leidde tot een extra vertraging van de tumor groei in vergelijking tot systemische behandeling van wild-type tumoren met synthetisch anginex. De verkregen resultaten suggereren dat het anginex gen kan worden toegepast voor gen therapie en dat een anti-angiogene behandeling het meest effectief is indien deze wordt toegepast wanneer een tumor initiëel begint te groeien.

Gen therapie is al vele jaren een veel belovende kanker therapie. Om deze verwachtingen waar te maken moeten de systemen die het gen naar de plaats van interesse brengen geoptimaliseerd worden en specifieke moleculen dienen geïdentificeerd te worden die het mogelijk maken alleen tumoren te behandelen. Het specifiek behandelen van tumor bloedvaten is met name interessant omdat deze goed toegankelijk zijn, minder gevoelig zijn voor het ontwikkelen van resistentie tegen de medicatie en waarschijnlijk niet al te veel bijwerkingen geven. In Hoofdstuk 5 beschrijven wij het gebruik van al bekende hulpmiddelen voor gen overdracht ten behoeve van een anti-angiogene behandeling. Hierbij hebben wij ons geconcentreerd op de meest voorkomende virale en niet virale gen overdracht methoden en hoe deze specifiek te maken zijn voor angiogenese.

Uit eerdere studies was bekend dat anginex zich specifiek verzameld in bloedvaten van tumoren. Dit leidde tot de hypothese dat anginex gebruikt kan worden als targeting ligand. Om deze toepassing te onderzoeken werd anginex geconjugeerd aan fluorescent gelabelde paramagnetische liposomen (Hoofdstuk 6).

Met behulp van fase contrast en fluorescentie microscopie hebben wij aangetoond dat deze geconjugeerde liposomen in staat waren te binden aan endotheel cellen. Wij hebben aangetoond dat deze binding het gevolg is van de aanwezigheid van anginex door het uitvoeren van competitie experimenten met niet geconjugeerd synthetisch anginex. Door het gebruik van een MRI-scanner (Magnetic Resonance Imaging) hebben we laten zien dat anginex minstens even goed werkt als targeting ligand als de al bekende en veel gebruikte cyclische RGD-peptiden. Deze studie suggereert het gebruik van anginex als ligand voor angiogenese targeting.

Om meer inzicht te krijgen in het mechanisme ten grondslag aan de anti-angiogene eigenschappen van anginex en om het molecuul verder te kunnen verbeteren, werd een studie gestart om de biologisch receptor van anginex te vinden door het gebruik van de gist 2-hybride techniek toe te passen. Hiermee werd galectine-1 (gal-1) geïdentificeerd als de voornaamste receptor (Hoofdstuk 7). Het blijkt dat gal-1 een hoger expressie niveau heeft in endotheel cellen van humane tumoren. Remming van gal-1 expressie *in vitro* en *in vivo* leidt respectievelijk tot remming van proliferatie en migratie van endotheel cellen en tot verstoorde en niet functionele bloedvat vorming. De functie van gal-1 in tumor angiogenese werd aangetoond in muizen zonder gal-1 expressie. In deze muizen was geen normale tumor groei ontwikkeling en tevens reageerden zij niet op additieve behandeling met anginex. Deze bevindingen veronderstellen dat gal-1 een belangrijke regulator is van tumor angiogenese en eventueel gebruikt kan worden als target/marker voor het toepassen van anti-angiogene kanker behandeling.

Uit de resultaten beschreven in dit proefschrift kan geconcludeerd worden dat zowel synthetisch als recombinant anginex potente angiostatische eiwitten zijn en dat het gebruik ervan niet gelimiteerd is tot het gebruik als angiogenese remmer na systemische toepassing. Het gen en daaruit voortkomende eiwit hebben de potentie om een waardevol hulpmiddel te zijn ten behoeve van gen therapie en een gerichte behandeling van kanker. De identificatie van de gal-1 als anginex receptor leidt mogelijk tot de ontwikkeling van nieuwe inhibitoren of interventie mogelijkheden voor tumor angiogenese.